

09/269711  
PCT/JP97/03997

31.10.97

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D	19 DEC 1997
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1996年11月 8日

出 願 番 号  
Application Number:

平成 8年特許願第311224号

出 願 人  
Applicant (s):

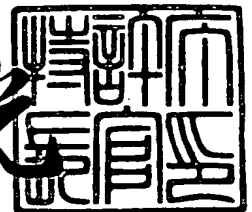
資酒造株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年12月 5日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平09-3100198

4193510

特平 8-311224

【書類名】 特許願

【整理番号】 1-961104-1

【提出日】 平成 8年11月 8日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光殿

【国際特許分類】 A61K 31/185 ADS  
A61K 31/725 ADS  
A23L 1/00  
A23L 2/00

【発明の名称】 アポトースス誘発剤

【請求項の数】 14

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央  
研究所内

【氏名】 小山 信人

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央  
研究所内

【氏名】 巽 容子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央  
研究所内

【氏名】 猪飼 勝重

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央  
研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代表者】 大宮 久

【代理人】

【識別番号】 100078503

【弁理士】

【氏名又は名称】 中本 宏

【代理人】

【識別番号】 100087022

【弁理士】

【氏名又は名称】 井上 昭

【代理人】

【識別番号】 100089428

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉嶺 桂

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 委任状 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポトーシス誘発剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を有効成分とすることを特徴とするアポトーシス誘発剤。

【請求項 2】 脂肪酸含有化合物が糖脂質である請求項 1 記載のアポトーシス誘発剤。

【請求項 3】 脂肪酸含有化合物が糖脂質と糖類及び／又はタンパク質との複合体である請求項 1 記載のアポトーシス誘発剤。

【請求項 4】 請求項 1 記載のアポトーシス誘発剤の製造方法において、植物又は微生物から脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を親水性有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求項 1 記載のアポトーシス誘発剤の製造方法。

【請求項 5】 植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を有効成分とすることを特徴とする制がん剤。

【請求項 6】 脂肪酸含有化合物が糖脂質である請求項 5 記載の制がん剤。

【請求項 7】 脂肪酸含有化合物が糖脂質と糖類及び／又はタンパク質との複合体である請求項 5 記載の制がん剤。

【請求項 8】 請求項 5 記載の制がん剤の製造方法において、植物又は微生物から脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を親水性有機溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする請求項 5 記載の制がん剤の製造方法。

【請求項 9】 植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を含有、添加及び／又は希釈してなることを特徴とする食品又は飲料。

【請求項 10】 脂肪酸含有化合物が糖脂質である請求項 9 記載の食品又は飲料。

【請求項 11】 脂肪酸含有化合物が糖脂質と糖類及び／又はタンパク質との複合体である請求項 9 記載の食品又は飲料。

【請求項 12】 請求項 9 記載の食品又は飲料の製造方法において、植物又は微生物から脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を親水性有機溶媒で抽出する工

程を包含することを特徴とする請求項9記載の食品又は飲料の製造方法。

【請求項13】 植物が双子葉植物、単子葉植物、藻類から選択される植物である請求項4、8、12のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項14】 微生物が担子菌類、子のう菌類、酵母、糸状菌、細菌から選択される微生物である請求項4、8、12のいずれか1項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、健康増強に有用な植物又は微生物由来の生理活性物質を有効成分とし、医薬として有用なアポトーシス誘発剤、制がん剤、該生理活性物質を含有する食品又は飲料、及びこれらの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、細胞組織の死に関し、アポトーシス (apoptosis、アポプトーシスともいう；自爆死あるいは細胞自滅) という様式が注目されている。

このアポトーシスは、病理的細胞死である壊死と異なり、細胞自身の遺伝子に最初から組込まれている死であると考えられている。すなわち何らかの外部的又は内部的要因が引き金となってアポトーシスをプログラムする遺伝子が活性化され、この遺伝子を基にプログラム死遺伝子タンパク質が生合成され、生成したプログラム死タンパク質により細胞自体が分解され、死に至ると考えられている。

このようなアポトーシスを所望の組織、細胞で発現せしめることができれば、不要若しくは病原細胞を自然の形で生体から排除することが可能となり、極めて意義深いものである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、植物又は微生物由来のアポトーシスを誘発する作用を有する安全性の高い抽出画分を開発し、該画分を含有するアポトーシス誘発剤、制がん剤、該画分を構成成分とする食品又は飲料、及びそれらの製造方法を提供することにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明はアポトーシス誘発剤に関し、植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を有効成分とすることを特徴とする。

本発明の第2の発明は、本発明の第1の発明のアポトーシス誘発剤の製造方法に関し、アポトーシス誘発剤の製造方法において、植物又は微生物から脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を親水性溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第3の発明は制がん剤に関し、植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を有効成分とすることを特徴とする。

本発明の第4の発明は、本発明の第3の発明の制がん剤の製造方法に関し、制がん剤の製造方法において、植物又は微生物から脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を親水性溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

本発明の第5の発明は食品又は飲料に関し、植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を含有、添加及び／又は希釈してなることを特徴とする。

本発明の第6の発明は、本発明の第5の発明の食品又は飲料の製造方法に関し、食品又は飲料の製造方法において、植物又は微生物から脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を親水性溶媒で抽出する工程を包含することを特徴とする。

【0005】

本発明者らは、植物又は微生物由来の糖脂質及び糖脂質の加水分解により得られる脂肪酸が強いアポトーシス誘発作用を有し、制がん作用を有することを見出し本発明を完成させた。

【0006】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明において使用できる植物又は微生物としては、アポトーシス誘発作用を有する脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を含有すれば良く、特に限定はないが

、植物としては、例えば、ほうれん草、茶、人参等の双子葉植物、麦、米等の単子葉植物、褐藻類、紅藻類、緑藻類、単細胞緑藻類等の藻類、微生物としてはリオフィラム ウルマリウム、ハタケシメジ等の担子菌類、ムシタケ等の子のう菌類、酵母、糸状菌、例えば麹菌、細菌、例えば納豆菌、乳酸菌等が例示される。

## 【0007】

本発明において、植物又は微生物由来のアポトーシス誘発作用を有する脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は含水親水性有機溶媒、例えば含水エタノールによる抽出工程を包含する製造方法により、簡便に製造することができるが、該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の製造方法においては特に限定はなく、単なる水抽出を含め、本発明に使用する脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の精製に使用できる公知の方法を使用することができる。また植物又は微生物を化学的、物理的、又は酵素学的に処理した後に、目的の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を精製しても良い。精製に際しては、脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の理化学的性質、又はアポトーシス誘発作用、制がん作用等の生理活性を指標にして精製しても良い。

## 【0008】

植物又は微生物由来の脂肪酸又は脂肪酸含有化合物の脂肪酸は飽和及び／又は不飽和脂肪酸であり、脂肪酸含有化合物としては糖脂質、糖と脂肪酸よりなる化合物、糖脂質と糖類及び／又はタンパク質との複合体等が包含される。

## 【0009】

本発明においてアポトーシス誘発作用を有する糖脂質とは特に限定はなく、例えばグリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴリン糖脂質が例示される。グリセロ糖脂質としてはグリセロ脂質のモノー及びジグリコシルジアシルグリセロール、スフィンゴ糖脂質としてはモノ、ジー及びオリゴグリコシルセラミドがあり、スフィンゴリン糖脂質はセラミドと糖鎖がリン酸ジエステルを介して結合している。

## 【0010】

本発明の植物又は微生物由来のアポトーシス誘発作用を有する脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は植物又は微生物から製造しても良く、また化学的に合成し

ても良い。

【0011】

本発明で使用する植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は、例えば食用植物や食用微生物の含水エタノール抽出物から通常のイオン交換樹脂処理、疎水クロマト処理、ゲルろ過処理等で精製することができる。

【0012】

植物又は微生物からの糖脂質の調製方法に特に限定はなく目的に応じた方法が用いられる。

一般的には、植物中の糖脂質は膜近辺に糖類及び／又はタンパク質と結合した高分子の形態で存在している場合が多く、例えば熱水で抽出することにより糖脂質と糖類及び／又はタンパク質が結合した本発明の脂肪酸含有化合物を得ることができる。なお糖類とは植物又は微生物中に存在する糖質であり、単糖、オリゴ糖、多糖、複合糖質を包含する。

更に好適には抽出条件として、親水性有機溶媒、例えば75%エタノール水溶液で抽出することにより効率よく上記脂肪酸含有化合物が抽出される。

【0013】

本発明においてはこのように得られた高分子の脂肪酸含有化合物をそのまま用いても良いが、使用目的に応じて、糖類及び／又はタンパク質を酵素的、化学的、及び／又は物理的に処理し、脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物、特に糖脂質等を精製、採取することにより、より純化された本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物、特に糖脂質等を得ることが可能である。

【0014】

上記方法で得られた本発明で用いられる物質は天然より得られる安全性の高い物であり、食品及び／又は飲料用として特に有用である。

更に純化された本発明の化合物を採取する方法としては、ブリゲーダイアー（Bligh-Dyer）法、フォルク（Folch）分配法等の公知の方法（日本生化学会編、新生化学実験講座、第4巻、脂質III、糖脂質、第104～109頁、1990年、東京化学同人）があり、目的に応じ、本発明の物質の抽出に用いることができる。



【0015】

得られた脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物はモノクローナル抗体等の標的細胞を認識するリガンドと結合させることにより、任意の標的細胞に特異的にアポトーシスを誘発させることができる。また標的細胞ががん細胞の場合は目的のがん細胞を選択的に制がん作用を発揮することができる。更にアルブミン等の担体と本発明の化合物を結合させることにより、より吸収性の高い物質が提供される。

【0016】

本発明のアポトーシス誘発剤は、植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すればよい。一般的には、本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

【0017】

本発明のアポトーシス誘発剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分であるアポトーシス誘発性を有する、植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を希釈剤としての注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、必要に応じ、殺菌剤、安定剤、等張化

剤、無痛化剤等を加えることにより調製される。

【0018】

本発明のアポトーシス誘発剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

【0019】

本発明のアポトーシス誘発剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り1～2000mg、好ましくは10～500mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0020】

制がん作用を有する、本発明の植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化すれば制がん剤を製造することができる。制がん剤の製造は上記方法に準じ行うことができる。一般的には、本発明の植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤であることができる。またこれを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

制がん剤としては、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれによっても投与することができる。

医薬用担体は、上記投与形態及び剤型に応じて選択することができ、上記アポトーシス誘発剤に準じ使用すれば良い。

制がん剤としては、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与される。投与方法

も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

#### 【0021】

制がん剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り1～1000mg、好ましくは10～200mgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の薬剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

#### 【0022】

本発明の薬剤は感染症、免疫機能の低下又は昂進あるいはがん疾患、ウイルス性疾患等の治療剤として用いることができる。また本発明のアポトーシス誘発剤により提供されるアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん、ウイルス性疾患等との関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。特に、食品として長い歴史を有する植物又は微生物より調製した脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は、経口投与の場合において、極めて安全性の高いものである。また本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は当然安全性は高く、そのアポトーシス誘発作用、アポトーシス作用による制がん作用により、消化器系がん等の予防、治療に極めて有用である。

#### 【0023】

本発明の食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀類、いも及びデンプン類、砂糖及び甘味料類、菓子類、油脂類、種実類、豆類、魚介類、獣鳥鯨肉類、卵類、乳類、野菜類、果実類、きのこ類、藻類、嗜好飲料類（非アルコール飲料、アルコール飲料）、調味料、醸造物（味噌、醤油、食酢）、酒類及び香辛料類並びに加工食品類が挙げられる。

#### 【0024】

本発明の食品又は飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に

用いられている食品又は飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品又は飲料に本発明の植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物が含有されていれば良い。

調理及び加工においては、調理、加工後にアポトーシス誘発性を有する本発明の植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物が含有されていれば良い。

すなわち調理・加工前、調理・加工時、更には調理・加工後にアポトーシス誘発性を有する脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を添加してもよいし、調理及び加工品やその材料を、該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物に添加し、該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を希釈してもよい。

【0025】

次に食品又は飲料の製造においては、任意の工程でアポトーシス誘発作用を有する、本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を含有させれば良く、また該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を添加してもよいし、食品又は飲料やその原料を、該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物に添加し、該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を希釈してもよい。また、添加は1回又は数回に渡って行ってもよい。したがって、簡便にアポトーシス誘発作用を有する食品又は飲料を製造することができる。いずれの工程を経た場合も、アポトーシス誘発性を有する、本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を含有する食品又は飲料、本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は本発明の食品又は飲料と定義される。

【0026】

本発明のアポトーシス誘発作用を有する、植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の食品中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えば該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の含有量は食品100部当たり0.001部以上、食品としての官能、アポトーシス誘発作用の面及びコストの面からは好ましくは0.005～10部、更に好ましくは0.01～1部である。

【0027】

本発明のアポトーシス誘発作用を有する、植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の飲料中の含有量は特に制限されず、その官能と生理活性の点より適宜選択できるが、例えば該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の含有量は飲料100部当り0.001部以上、飲料としての官能、アポトーシス誘発作用の面及びコストの面からは好ましくは0.005～10部、更に好ましくは0.01～1部である。なお、本明細書において部は重量部を意味する。

## 【0028】

本発明の食品又は飲料としては、本発明のアポトーシス誘発性を有する、本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物が含有、添加及び／又は希釈されていれば特にその形状に限定は無く、タブレット状、顆粒状、カプセル状、ゲル状、ゾル状等の形状の経口的に摂取可能な形状物も包含する。

## 【0029】

本発明の食品又は飲料は生理活性を有する本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を多量に含有し、該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の有するアポトーシス誘発作用によって、これらを摂取することにより発がん予防、がん抑制効果、抗潰瘍効果、アルツハイマー病予防効果を有する健康食品又は飲料であり、特に胃腸健康保持に有用な食品又は飲料である。

本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は天然植物又は微生物由来であり、特に天然食品植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物の食品又は飲料への使用は極めて安全性に優れたものである。

## 【0030】

本発明のアポトーシス剤を使用するアポトーシス誘発方法は生体防御機構、免疫機能あるいはがん、ウイルス性疾患等との関係の研究、アポトーシス誘発阻害剤の開発等に有用である。特に、食用植物又は微生物中の本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は食品として長い歴史を有するものであり、これらから調製した本発明の抽出物は、経口投与の場合において、極めて安全性の高いものである。したがって、該脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は当然安全性は高く、そのアポトーシス誘発作用により消化器系がん等の予防、治療に極めて有用である。

【0031】

以上、本発明に使用する脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は植物又は微生物の膜画分に多量に存在し、特に食用植物又は微生物より安価にかつ簡便に製造できる。またその疎水性の度合いにより、好適な含水親水性溶媒を選択することにより、目的の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を選択的に精製することができる。本発明の植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は、そのアポトーシス誘発作用、制がん作用を食品又は飲料に簡便に付与することができ、本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は食品又は飲料への添加剤として極めて有用である。

【0032】

【実施例】

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。なお、実施例における％は重量％を意味する。

【0033】

実施例 1

海藻からのアポトーシス誘発作用を有する組成物の調製

(1) ガゴメ昆布を十分乾燥後、乾燥物 20 kg を自由粉砕機（奈良機械製作所製）により粉砕した。

水道水 900 リットルに塩化カルシウム二水和物（日本曹達社製）7.3 kg を溶解し、次にガゴメ昆布粉砕物 20 kg を混合した。液温 12℃ から液温 90℃ となるまで水蒸気吹込みにより 40 分間昇温させ、次いでかくはん下 90～95℃ に 1 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 1100 リットルを得た。

次いで固液分離装置（ウエストファリアセパレーター社製 CNA 型）を用い、冷却物の固液分離を行い、約 900 リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液 360 リットルをダイセル社製 FE10-FC-FUS0382（分画分子量 3 万）を用い、20 リットルまで濃縮した。次いで水道水を 20 リットル加え、また 20 リットルまで濃縮するという操作を 5 回を行い、脱塩処理を行い、海藻由来の抽出液 25 リットルを調製した。

該溶液1リットルを凍結乾燥し、乾燥物13gを得た。

【0034】

(2) 実施例1-(1)記載の抽出液1.4リットルを、0.2M  $\text{CaCl}_2$  含有20mM酢酸緩衝液、pH6で透析し、透析内液を得た。DEAE-Sephacrose Fast Flowカラム( $\phi 14\text{cm} \times 45.5\text{cm}$ )を同緩衝液にて平衡化し、透析内液をアプライ後、同緩衝液で洗い、2M  $\text{NaCl}$  含有同緩衝液にて濃度勾配法により溶出させた。フェノール硫酸法及びカルバゾール硫酸法にて、総糖含量及びウロン酸含量を求め、溶出順にA画分、B画分及びC画分を得た。これらを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥し、B画分760mgを得た。

このB画分にアポトーシス誘発活性が認められた。

【0035】

図1に抽出液のDEAE-Sephacrose Fast Flowカラム溶出パターンを示す。すなわち図1は海藻由来抽出物のDEAE-Sephacrose Fast Flowカラム( $\phi 14\text{cm} \times 45.5\text{cm}$ )の溶出パターンを示す図であり、縦軸はカルバゾール硫酸法での530nmの吸光度、フェノール硫酸法での480nmの吸光度、及び電導度( $\text{mS/cm}$ )、横軸はフラクション番号を示し、図中白丸印がフェノール硫酸法での480nmの吸光度、黒丸印がカルバゾール硫酸法での530nmの吸光度、図中実線が $\text{NaCl}$ 濃度勾配を示す。なお1フラクションの液量は1000mlである。

【0036】

(3) 上記方法にて分画したB画分8.6gを最終濃度1M  $\text{NaCl}$ に調製し、1M  $\text{NaCl}$ で平衡化したPhenyl-Sephacrose 6 Fast Flowカラム( $\phi 4.4\text{cm} \times 20\text{cm}$ )にアプライした。1M  $\text{NaCl}$ でカラムを洗浄後、水への濃度勾配により溶出される画分を得た。これをロータリーエバポレーターにて濃縮後、蒸留水に対して透析し、約6.5mlの精製画分を得た。精製画分を凍結乾燥し、精製物60mgを得た。この精製物にアポトーシス誘発活性が認められた。

【0037】

## (4) 精製物のアポトーシス誘発作用の測定

上記B画分、及び実施例1-(3)記載の精製物につきアポトーシス誘発活性を以下の通りに測定した。牛胎児血清10%を含有するRPMI 1640培地に培養したHL-60(ATCC CCL-240)  $2.5 \times 10^5$  個/4.5 mlに、B画分又は該精製物の水溶液0.5 mlを添加し、37℃、48時間培養した。同時に対照試料として、蒸留水及びアポトーシス誘発活性を有することが判っているアクチノマイシンD溶液( $10 \mu\text{g/ml}$ )を添加した。光学顕微鏡下で、アポトーシス小体の形成、細胞の収縮、核の凝縮を肉眼観察し、生細胞数をカウントした。これらの現象が観察され、生細胞数の減少が認められるものを、アポトーシス誘発活性有りと判断した。

## 【0038】

B画分、精製物及びアクチノマイシンD添加においてアポトーシス誘発作用が確認された。その結果を図2に示す。すなわち図2は上記HL-60細胞の培養液に最終濃度 $2 \text{ mg/ml}$ のB画分又は最終濃度 $0.9 \text{ mg/ml}$ の脂溶性精製物を添加したときの培養時間と培養液中の生細胞数の関係を示す図であり、横軸は培養時間(時間)、縦軸は培養液中の生細胞数( $\times 10^5$  個/5 ml)を示す。図中白四角印は水添加の対照、白ひし形印はB画分添加、白丸印は精製物添加をそれぞれ示す。

## 【0039】

## (5) アポトーシス誘発作用を有する精製物の理化学的性質

実施例1-(3)記載の精製物の理化学的性質を測定した。

## (i) NMR分析

JNM-A500核磁気共鳴装置(日本電子社製)を用いて $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを測定した。

その結果を図3で表される $^1\text{H}$ -NMRスペクトルで示した。図3において縦軸はシグナルの強度、横軸は化学シフト値(ppm)を示す。なお、 $^1\text{H}$ -NMRでの化学シフト値はHODの化学シフト値を4.65 ppmとして表した。

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )

$\delta 0.7$  (脂肪酸の末端のメチルのH)、 $1.1$  (脂肪酸のメチレン及びフコースの



C-5位のメチルの H)、3.1 ~ 5.6 (糖に由来するH)

【0040】

(ii) GC-MS分析

実施例1-(3)記載の精製物2mgを取り、5%塩酸メタノール溶液1mlを加え封管し、85℃で3時間加熱した。冷後、n-ヘキサン1mlで3回抽出し、得られたn-ヘキサン抽出液を窒素気流で約500μlに濃縮し、試料Aとした。

残りのメタノール層に炭酸銀を加え中和した後、ろ過し、ろ液を窒素気流を吹付けて濃縮乾固し、真空ポンプで4時間乾燥した。乾燥後、残渣にTMS試薬(ヘキサメチルジシラザン2.6mlを乾燥ピリジン2.0mlに加え、次いでトリメチルクロロシラン1.6mlを加えた後、生じた白濁物質を遠心分離して除いた上清を使用)5滴を加え、室温に30分間放置した。次いで、50℃で10分間加温し、冷後、クロロホルム1mlを加えかくはん後、クロロホルム層を水1mlで3回洗浄した。得られたクロロホルム溶液を試料Bとした。

【0041】

上記、試料A及びBをDX-302質量分析計(日本電子社製)を用いて下記条件でGC-MS分析に供した。

試料A

カラム: TC-1 (ジーエルサイエンス) 30 m× 0.25 mm I.D.

温度: 130℃から250℃まで 4℃/minの昇温、250℃で5分間の維持

流量: ヘリウムガス、1.2 ml/min

マススペクトル測定質量範囲: m/z 50~ 500

マススペクトル測定繰り返し時間: 3秒

試料B

カラム: TC-1 (ジーエルサイエンス) 30 m× 0.25 mm I.D.

温度: 130℃から300℃まで 4℃/minの昇温、300℃で5分間の維持

流量: ヘリウムガス、1.2 ml/min

マススペクトル測定質量範囲: m/z 50~ 800

マススペクトル測定繰り返し時間: 3秒

【0042】

その結果、試料A、試料Bはそれぞれ図4、図5で表される全イオンクロマトグラムを示した。各図において縦軸は相対強度（%）、横軸上部は保持時間（分）、下部はスキャン番号を示す。

【0043】

試料A、試料Bより得られたクロマトグラム中のピークの構造の確認はそれぞれのピークのマススペクトルを解析することにより行った。

試料Aからは主成分としてテトラデカン酸（ミリスチン酸）（ピーク2）、ヘキサデカン酸（パルミチン酸）（ピーク3）、及びテトラデセン酸（ピーク1）の各メチルエステルが確認された。

また、試料Bからはグリセロール由来のピーク（ピーク1）、フコース由来のピーク（ピーク2、3、4）、キシロース由来のピーク（ピーク5、6）、マンノース由来のピーク（ピーク7）、ガラクトース由来のピーク（ピーク8、9、10）、及びグルクロン酸由来のピーク（ピーク11）が確認された。

以上、上記精製物にはグリセロ糖脂質が含有されていることが判明した。

【0044】

実施例2

（1）きのこからのアポトーシス誘発作用を有する抽出液の調製

特公平6-34660号公報記載の方法に従って、*Lyophyllum ulmarium* M-8171（FERM BP-1415）を栽培し、リオフィラム ウルマリウム子実体を調製した。なおこの子実体は「やまびこほんしめじ」として市販されている子実体と同一物である。また特開昭3-65261号公報記載の方法に従って*Lyophyllum decastes* K-3304（FERM BP-4348）を栽培し、リオフィラム デカステス（和名ハタケシメジ）子実体を調製した。これらの子実体と、市販のマイタケ、エノキタケ、シイタケ、ナメコをそれぞれ凍結乾燥し、凍結乾燥物を調製し、その粉碎物を調製した。

上記きのこの粉碎物各0.5gに75%エタノール水溶液を添加し、室温で2時間抽出した。遠心分離により、抽出液を得た後、該抽出液の濃縮乾固を減圧下で行い、乾燥物を調製した。この乾燥物を水1mlに溶解し、エタノール抽出液

を調製した。

【0045】

(2) アポトーシス誘発活性の測定

上記実施例2-(1)記載のエタノール抽出液のアポトーシス誘発作用を測定した。

エタノール抽出液をそれぞれGD/X PESフィルター(ワットマン社製)でろ過滅菌し、滅菌水で希釈系列を作製した。各希釈液 $10\mu\text{l}$ を96穴マイクロタイタープレートのウェルに入れ、そこに5000個のHL-60細胞を含む10%牛胎児血清含有RPMI 1640培地 $100\mu\text{l}$ を加え、5%炭酸ガス存在下、 $37^{\circ}\text{C}$ で48時間培養した。細胞の形態を光学顕微鏡で観察した後、 $5\text{mg/ml}$ の3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT;シグマ社製)リン酸緩衝食塩水溶液 $10\mu\text{l}$ を加えて更に4時間培養を続けた後、顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。また、 $0.04\text{N}$  HCl含有2-プロピルアルコール $100\mu\text{l}$ を加えてよくかくはんし、 $590\text{nm}$ における吸光度を測定してこれを細胞増殖度とした。

きのこのエタノール抽出液のアポトーシス誘発活性に関しては、リオフィラム・ウルマリウム(30倍希釈液)と、ハタケシメジ(10倍希釈液)で細胞は死滅し、強いアポトーシス誘発活性が認められた。またマイタケ、エノキタケ、シイタケ、ナメコの3倍希釈液で細胞は死滅しており、10倍希釈液においてアポトーシス小体が見られ、各きのこのエタノール抽出液は強いアポトーシス誘発作用を有していた。

きのこのエタノール抽出物のGC-MSにより、糖脂質の存在を確認した。

【0046】

実施例3

茶抽出物のアポトーシス誘発活性

市販の抹茶 $0.5\text{g}$ に水又は75%エタノール水溶液 $25\text{ml}$ を加え、室温で2時間振とうした。抽出物を遠心分離した後、上清を減圧下濃縮乾固し、 $1\text{ml}$ の水に溶解した。

この抽出液を1倍から100倍まで希釈し、希釈液 $10\mu\text{l}$ と5000個のH

L-60細胞を含む10%ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地100 $\mu$ lを96穴マイクロタイタープレートのウェルに添加して48時間培養し、光学顕微鏡で細胞の生育状態を観察した。その結果、水抽出物、75%エタノール抽出物共にすべての希釈段階添加区分で細胞は死滅しており、茶の水抽出物、エタノール抽出物は強いアポトーシス誘発作用を有していた。

各抽出物についてのGC-MSにより、糖脂質の存在を確認した。

【0047】

#### 実施例4

##### 米糠抽出物のアポトーシス誘発活性

米糠0.5gに水、75%エタノール水溶液又は90%エタノール水溶液を加え、室温で2時間振とうした。抽出物を遠心分離した後、上清を減圧下濃縮乾固し、1mlの水に溶解した。90%エタノール水溶液抽出物に関しては水不溶物をエタノールに溶解した。これらの試料を希釈して実施例3と同様にアポトーシス誘発活性を測定したところ、水抽出物は5倍希釈液、75%エタノール抽出物是非希釈液、90%エタノール抽出物はエタノール可溶画分の10倍希釈液に活性が見られ、米糠のエタノール抽出物は強いアポトーシス誘発作用を有していた。

エタノール抽出物についてのGC-MSにより、糖脂質の存在を確認した。

【0048】

##### 【発明の効果】

本発明により、植物又は微生物由来の強いアポトーシス誘発作用を有する脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物を含有するアポトーシス誘発剤が提供され、そのアポトーシス誘発作用による制がん剤も提供される。この脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物は植物又は微生物の膜成分中に糖脂質として多量に存在し、含水エタノール抽出等により効率よく抽出され、簡便に本発明の有効成分を得ることができる。またその疎水性の度合いにより、抽出溶媒の極性が選択でき、目的の糖脂質等を選択的に製造することができる。特に食用植物又は微生物から精製した本発明の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物、例えば糖脂質等を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料は日常的に摂取することにより健康が増進し、

健康食品として極めて有用なものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

透析内液のDEAE-Sephacrose Fast Flow カラムによる溶出パターンを示す図である。

【図2】

B画分及び精製物のアポトーシス誘発作用を示す図である。

【図3】

精製物のNMRスペクトルを示す図である。

【図4】

試料AのGC-MSスペクトルを示す図である。

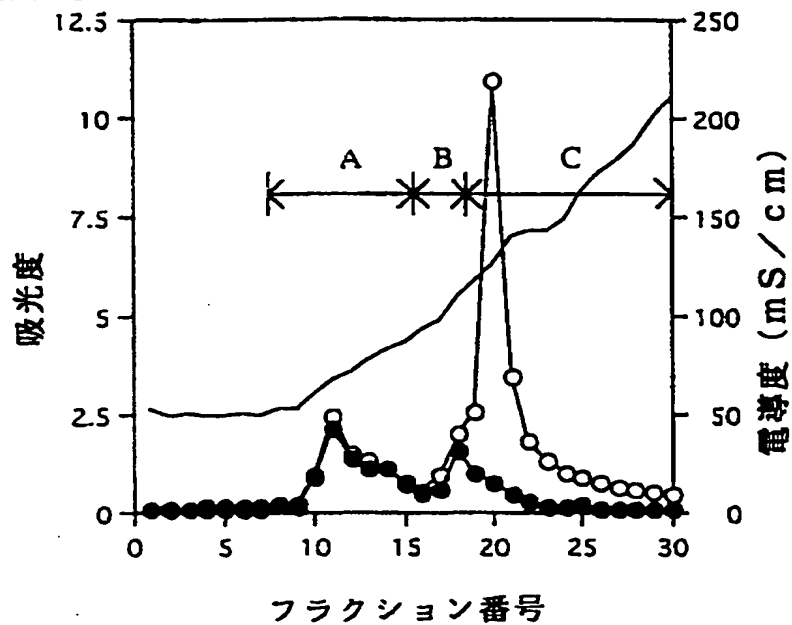
【図5】

試料BのGC-MSスペクトルを示す図である。

【書類名】図面

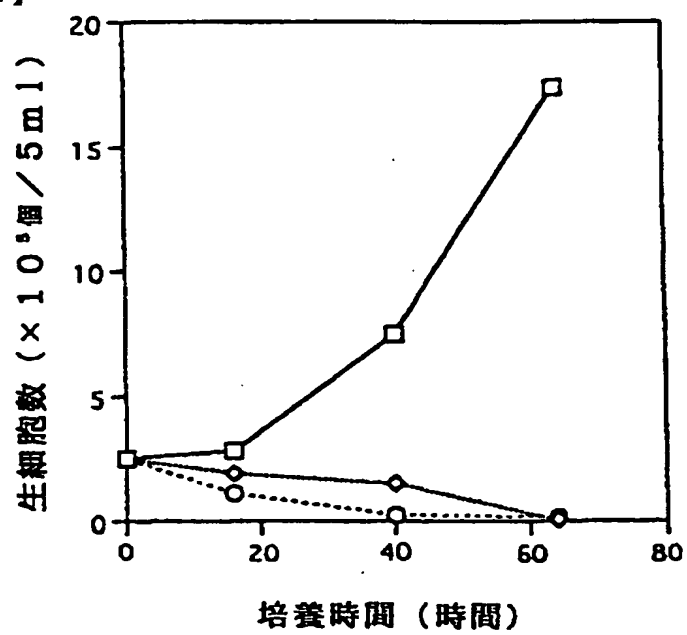
1 / 5

【図1】



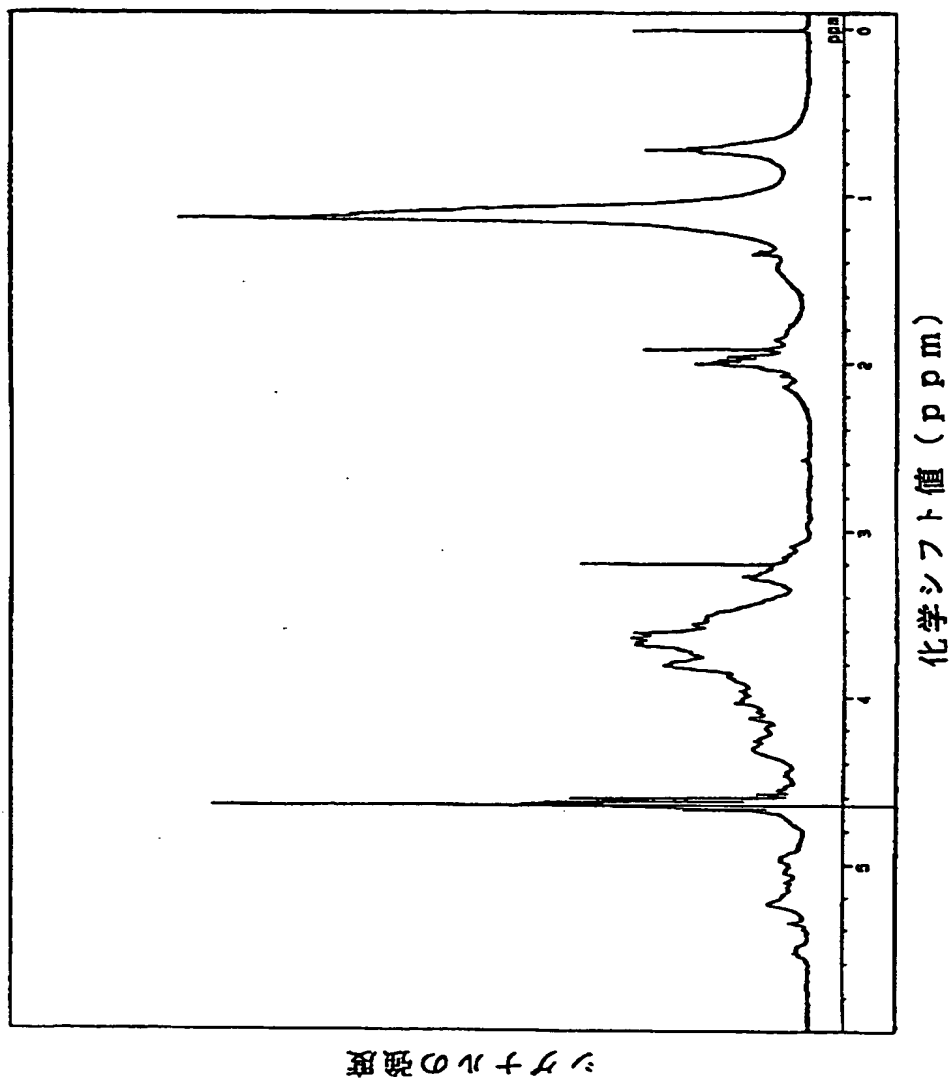
【図2】

2/5



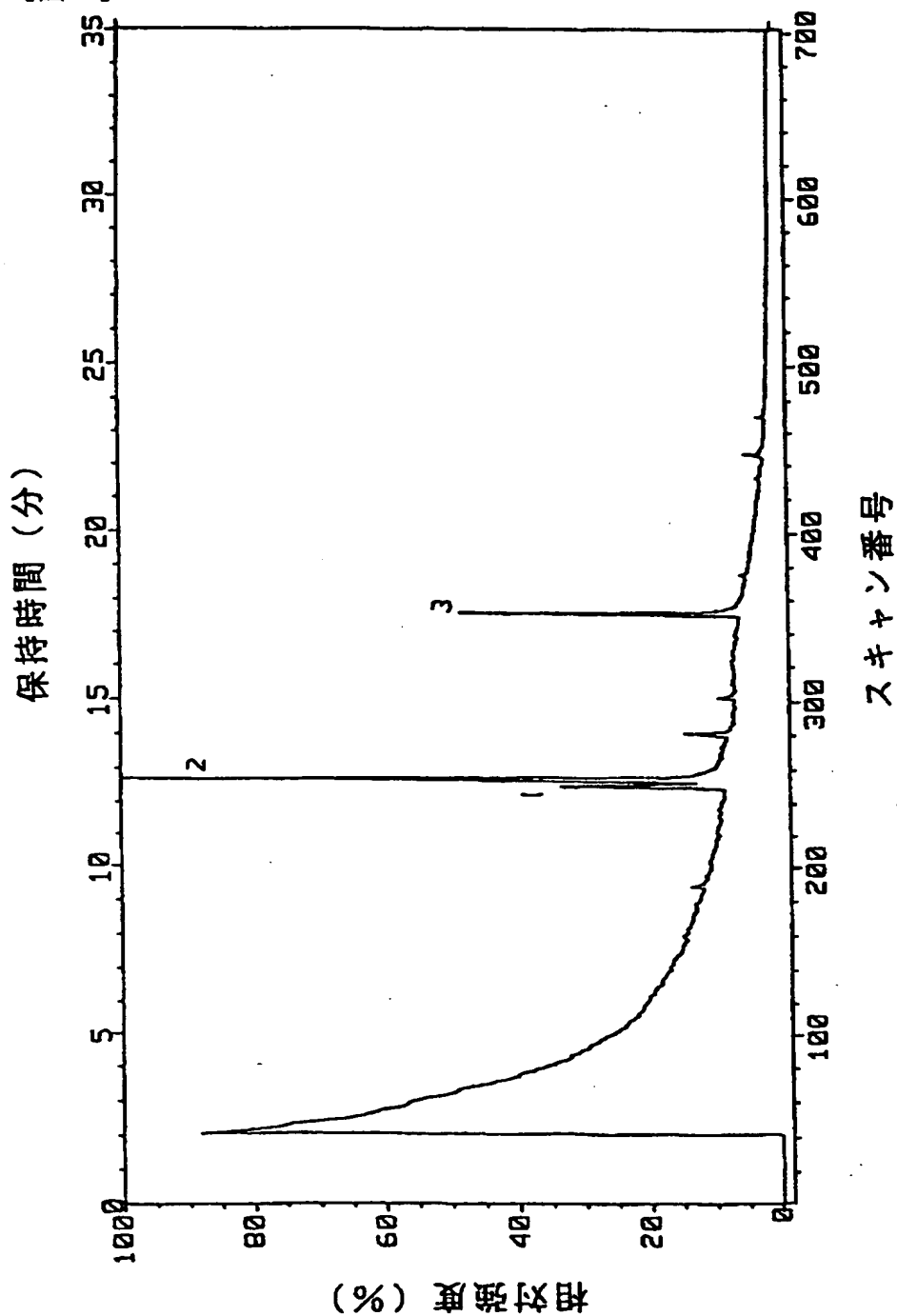
【図3】

3/5

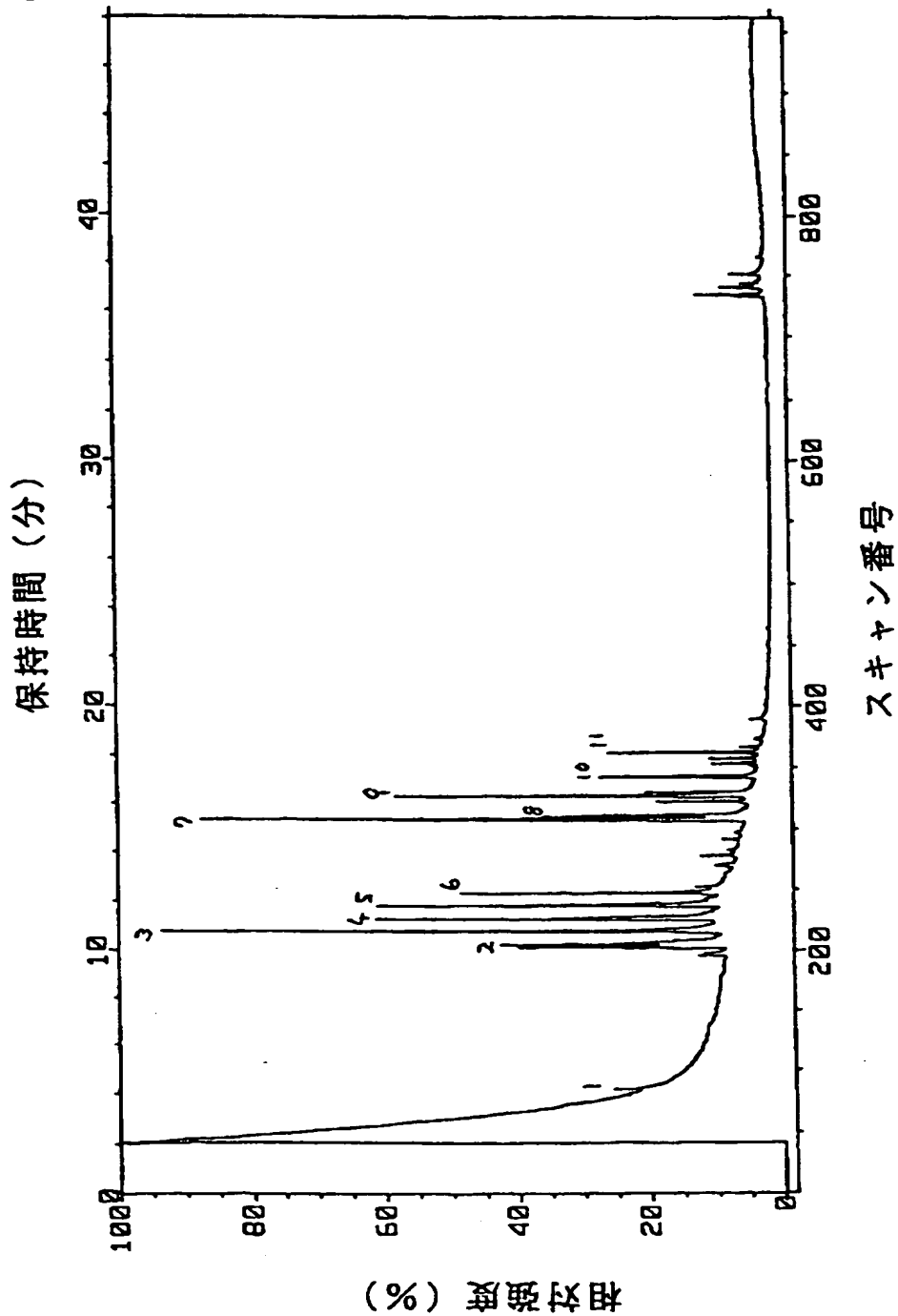




【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 アポトーシス誘発剤、制がん剤、あるいはそれらを構成成分とする食品又は飲料、及びそれらの製造方法を提供する。

【解決手段】 植物又は微生物由来の脂肪酸及び／又は脂肪酸含有化合物（以下、脂肪酸等という）を、有効成分とするアポトーシス誘発剤又は制がん剤。あるいは該脂肪酸等を含有、添加及び／又は希釈してなる食品又は飲料。該脂肪酸等を親水性有機溶媒で抽出する工程を包含する前記した各物の製造方法。該脂肪酸含有化合物の例には、糖脂質、あるいは糖脂質と糖類及び／又はタンパク質との複合体がある。

【選択図】 なし

委 任 状

平成 8 年 // 月 7 日

私は、識別番号 100078503 弁理士 中 本 宏氏、  
識別番号 100087022 弁理士 井 上 昭氏、  
識別番号 100089428 弁理士 吉 嶺 桂氏、  
をもって代理人として下記事項を委任します。

記

1. 特許出願

に関する一切の件

2. 上記出願に関する放棄又は取下げ
3. 上記出願に関する出願審査等の請求又は申立ての取下げ
4. 上記出願に関する優先審査等の申請又は申立ての取下げ
5. 上記出願に関する出願人名義変更
6. 上記出願に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の優先権主張並びにその取下げ
7. 特許法第46条第1項及び第2項の出願変更又は実用新案法第10条第1項及び第2項の出願変更
8. 特許法第121条第1項の審判の請求又はその取下げ
9. 上記事項を処理するための復代理人の選任及び解任

住 所 京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 實酒造株式会社

代表取締役 大 宮 久



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 591038141  
【住所又は居所】 京都府京都市伏見区竹中町609番地  
【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100078503  
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7  
階 吉嶺特許事務所

【氏名又は名称】 中本 宏

【代理人】 申請人

【識別番号】 100087022  
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7  
階 吉嶺特許事務所

【氏名又は名称】 井上 昭

【代理人】 申請人

【識別番号】 100089428  
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目8番7号 とみたやビル7  
階 吉嶺特許事務所

【氏名又は名称】 吉嶺 桂

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

特平 8-311224

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 {591038141}

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

氏 名 寶酒造株式会社